

Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički
fakultet Biološki odsjek

Luka Protega

DETEKCIJA VIRUSA TRISTEZA
(*Citrus tristeza virus*) U AGRUMIMA
MODIFICIRANOM METODOM ELISA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički
fakultet Biološki odsjek

Luka Protega

DETEKCIJA VIRUSA TRISTEZA
(*Citrus tristeza virus*) U AGRUMIMA
MODIFICIRANOM METODOM ELISA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju Zavoda za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Silvije Černi. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Ovim putem se zahvaljujem svim članovima istraživačkog tima na suradnji. Također, zahvaljujem dr. sc. Katarini Hančević na pomoći pri uzorkovanju, savjetima i podršci, kao i članovima povjerenstva za obranu rada. Posebnu zahvalnost dugujem docentici Silviji Černi, koja je, kroz strpljivo vođeno mentorstvo, omogućila da ovaj rad bude napisan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

DETEKCIJA VIRUSA TRISTEZA (*Citrus tristeza virus*) U AGRUMIMA MODIFICIRANOM METODOM ELISA

Luka Protega

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus tristeza (*Citrus tristeza virus*, CTV) uzročnik je ekonomski značajne bolesti agruma. Ovisno o kombinaciji domaćina/genotipa virusa varira i intenzitet simptoma. U jake simptome ubraja se i jamičavost drva koju karakterizira deformacija drva inficirane biljke u obliku utora/jamica. Cilj rada bio je metodom ELISA provjeriti prisutnost virusa CTV u 46 indikatorskih biljaka koje su 2008. ciljano zaražene virusom te utvrditi eventualne razlike u „preživljenju“ različitih virusnih genotipova. Osim standardnom ELISA-detekcijom korištenjem homogenata floema, karakterističnog mjesta replikacije virusa, iskušana je detekcija virusa iz poprečnih prereza grana sa i bez pripadajućeg floema. Pretpostavka je bila da će modificirana metoda uz korištenje prereza grana s floemom dati rezultate identične onima dobivenim iz ekstrakata floema, dok će korištenje prereza grana bez floema dati pozitivne rezultate samo kod biljaka sa simptomima jamičavosti drva. Standardnom ELISA-detekcijom potvrđena je prisutnost virusa u 52,2% uzoraka te je uočena razlika u stopi „preživljenja“ različitih virusnih genotipova. Osjetljivost testiranja modificiranim postupkom korištenjem drva s floemom bila je nešto manja u odnosu na standardni ELISA-protokol. Modificirana metoda uz korištenje prereza drva bez floema potvrdila je prisutnost virusa u 66,7% uzoraka povezanih sa simptomima jamičavosti drva što ukazuje na potencijal modificirane metode u selektivnoj detekciji ovih virusnih genotipova.

(39 stranica, 9 slika, 7 tablica, 93 literaturna navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: serološka detekcija, ELISA, biljni virus, virusni genotip

Voditelj: Dr. sc. Silvija Černi, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Silvija Černi, doc.

Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.

Dr. sc. Marin Ježić, doc. (zamjena)

Rad je prihvaćen na sjednici održanoj 19. 9. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

CITRUS TRISTEZA VIRUS DETECTION IN CITRUS USING A MODIFIED ELISA METHOD

Luka Protega

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Citrus tristeza virus (CTV) is the causing agent of an economically significant citrus fruit disease. Depending on the combination of hosts/genotypes of the virus, the intensity of the symptoms may vary. Among strong symptoms is the stem pitting, characterized by a deformation of the wood of the infected plant characterized by the occurrence of small holes/pits. The goal of the work was to use the ELISA method to search for the presence of the CTV virus in 46 indicator plants, which were experimentally infected in 2008, and to determine the possible differences in the “survival” of the different virus genotypes. Apart from the standard ELISA detection by using the phloem extracts, the characteristic tissue where virus replicates, detection of the virus from transverse cuts of the branches, with and without the phloem tissue was also conducted. The hypothesis was that the modified method when using the cuts with the phloem tissue will give results identical to those gained from the phloem extract, while using the branch cuts without the phloem will give positive results only in those plants in which the presence of stem pitting symptom has been observed. Using standard ELISA detection, the presence of the virus was confirmed in 52.2% of the samples, and a difference in the rate of “survival” of the different viral genotypes has been observed. The sensitivity of testing by the modified procedure using the wood with the phloem showed less sensitivity when compared with the standard ELISA protocol. The modified method using the cuts without the phloem confirmed the presence of the virus in 66,7% of samples related to stem pitting symptoms, which points to a prospective of a modified method in a selective detection of stem pitting causing viral genotypes.

(39 pages, 9 figures, 7 tables, 93 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in the Central Biological Library

Keywords: serological detection, ELISA, plant virus, virus genotype

Supervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.

Dr. Marin Ježić, Asst. Prof. (backup reviewer)

Thesis accepted: 19. 9. 2018.

POPIS KRATICA

AP	Alkalna fosfataza
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i> / virus tristeza
CP	<i>Coat protein</i> / kapsidni protein
DAS-ELISA	<i>Double Antibody Sandwich ELISA</i>
DIECA	Dietil ditiokarbamat
DTBIA	<i>Direct tissue blot immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
MAIB	<i>Mediterranean Agronomic Institute – Valenzano, Bari</i>
OD	<i>Optical density</i> / optička gustoća
ORF	<i>Open reading frame</i> / otvoreni okvir čitanja
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> / lančana reakcija polimerazom
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> / analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> / analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA
SP	<i>Stem Pitting</i> / jamičavost drva

Sadržaj

1.UVOD	1
1.1.Virus tristeza	1
1.1.1.Taksonomski položaj	1
1.1.2.Domaćinske biljke	2
1.1.3.Podrijetlo virusa	2
1.1.4.Geografska distribucija	4
1.1.5.Rasprostranjivanje virusa.....	5
1.1.6.Morfološke karakteristike	5
1.1.7.Genom i replikacija virusa	6
1.1.8.Virusni genotipovi	7
1.1.9.Virusni fenotip	8
1.1.9.1.Sindrom brzog propadanja i smrti stabla	9
1.1.9.2.Jamičavost drva.....	10
1.1.9.3.Žutica sjemenjaka	11
1.1.9.4.Prosvjetljenje ili oplutnjavanje lisne nervature.....	11
1.1.10.Detekcija i karakterizacija.....	12
1.1.10.1.Biološko testiranje	13
1.1.10.2.Serološka detekcija	13
1.1.10.3.Molekularna detekcija i karakterizacija	14
2.CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3.MATERIJALI I METODE	16
3.1.Uzorak.....	16
3.2.Serološka detekcija metodom ELISA	19
4.REZULTATI.....	22
4.1.Detekcija virusa CTV standardnim ELISA-testom	22
4.2.Detekcija virusa CTV modificiranim ELISA-testom	25
5.RASPRAVA	27
6.ZAKLJUČAK.....	30
7.LITERATURA	31
9.ŽIVOTOPIS.....	39

1. UVOD

1.1. Virus tristeza

1.1.1. Taksonomski položaj

Virus tristeza (*Citrus tristeza virus*, CTV) je uzročnik devastirajućih epidemija istoimene bolesti, tristeza, koja već čitavo stoljeće mijenja ekonomske tokove industrije agruma širom svijeta (Candresse 1995, Moreno i sur. 2008).

Vrsta CTV na temelju razlika u morfološkim, biološkim i molekularnim karakteristikama pripada porodici *Closteroviridae*, rod *Closterovirus* (<https://gd.eppo.int/taxon/CTV000>, Bar-Joseph i sur. 1979, Dolja i sur. 1995).

Porodica *Closteroviridae* sadrži više od trideset filamentoznih biljnih virusa s jednolančanim RNA-genomom pozitivnog smisla, koje se na semiperzistentan način prenose kukcima (Dolja i sur 1995, Karasev 2000). Članovi porodice *Closteroviridae* prema vrsti vektora kojim se rasprostranjuju, veličini i strukturi virusnog genoma dijele se na tri roda (Karasev 2000, Martelli i sur. 2002):

- a. Rod *Closterovirus* – rasprostranjuju se lisnim ušima, imaju jednodijelni genomom veličine 15,5-19,3 kb, a predstavnik je *Beet yellows virus* (BYV).
- b. Rod *Ampelovirus* - rasprostranjuju se štitastim ušima iz porodica *Pseudococcidae* i *Coccidae*, imaju jednodijelni genom veličine 16,9-19,5 kb, a predstavnik je *Grapevine leafroll virus 3* (GLRV-3).
- c. Rod *Crinivirus* – rasprostranjuju se štitastim moljcima, čine ga virusi s dvodijelnim genomom veličine 15,3-19 kb, a predstavnik je *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV).

Postoji još pet virusnih vrsta iz porodice *Closteroviridae* koje nisu klasificirane unutar tri definirana roda.

Zbog svojih karakteristika, CTV se nalazi na Europskoj i mediteranskoj organizaciji za zaštitu bilja (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) A2 listi karantenskih patogena/Virusi i virusima slični organizmi (EPPO Standards 2017). Ovaj veliki RNA virus koji parazitira na spororastućim domaćinima je uzet kao osnovni molekularnobiološki model za proučavanje interakcije virus-virus i virus-domaćin u višegodišnjim poljoprivrednim kulturama (EPPO Standards 2017, Dawson i sur. 2015).

1.1.2. Domaćinske biljke

Virus CTV inficira sve vrste, sorte i hibride agruma (Dolja i sur. 2006). Replicira se u stanicama floema (Dawson i sur. 2015). Postoji razlika u tropizmu između korijena i izdanaka/pupova. U biljkama čiji su pupovi otporni na CTV ili na njegove određene genotipove, korjenje može biti potpuno zaraženo, dok nema skoro niti jedne virusne čestice u pupovima (Harper i sur. 2014). U nekim vrstama, virus se akumulira ranije i u višem titru u korjenu nego u izdancima (Dawson i sur. 2015).

I virus CTV i domaćini agrumi su stoljećima, vjerovatno, koevoluirali na prostoru jugoistočne Azije, tako što je CTV prilagođavao svoju replikaciju u stanicama floema nekoliko vrsta unutar porodice rutvica (*Rutaceae*), kao i svoje rasprostranjivanje na agrume preko nekoliko vrsta lisnih uši (*Aphidae*) (Moreno i sur. 2008, Bar-Joseph i sur. 1989). S obzirom da se CTV ne prenosi sjemenom, domaćinske biljke koje rastu na vlastitom korijenu, tj. sjemenjaci, uglavnom ne pokazuju simptome infekcije (Moreno i sur. 2008).

CTV zaražava i neke citrusima slične rodove, kao što su *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Fortunella* i *Pamburus* te neke hibride (Bar-Joseph i sur. 1989). Vrste pasiflora inficirane su eksperimentalno (ne i prirodnim putem) i jedini su eksperimentalni domaćini koji nisu iz porodice rutvica. CTV domaćini su: *Afraegle paniculata*, *Citrus aurantiifolia* (Meksička limeta), *Citrus paradisi* (Grepfrut), *Citrus reticulata* (Mandarina), *Pamburus missionis* i *Passiflora* te najčešći *Citrus aurantium* i *Citrus sinensis* (Roistacher 1981).

1.1.3. Podrijetlo virusa

Rasprostranjenost virusa CTV u prirodi je posredovana vektorima kukcima/lisnim ušima, dok je širenje infekcije na velike udaljenosti uglavnom posljedica dva faktora, razvoja transporta brodovima i cijepljenja inficiranog sadnog materijala na podlogu zbog osjetljivosti komercijalnih sorti citrusa na gljivicu *Phytophthora* (Bar-Joseph i sur. 1979, Moreno i sur. 2008).

S početka XIX stoljeća, prenos čitavih biljaka, od kojih su neke bili asimptomatski nosioci virusa iz područja podrijetla komercijalnih sorti agruma, doveo je do širenja virusa CTV (Dawson i sur. 2015, Roistacher 1981). Bolest tristeza počinje se bilježiti s početkom komercijalne proizvodnje agruma, kada se radi povećanja produktivnost i ublažavanja simptoma infekcija gljivičnim patogenima, agrumi cijepe. Sa pojavom epidemije gljivicom *Phytophthora*, koja je na području Mediterana desetkovala nasade sjemenjaka i stabala cijepljenih na slatku naranču i limun, započinje široka primjena podloge gorka naranča (Bar-Joseph i sur. 1989). Ona je rezistentna na gljivičnu infekciju i ima dobre uzgojne kvalitete.

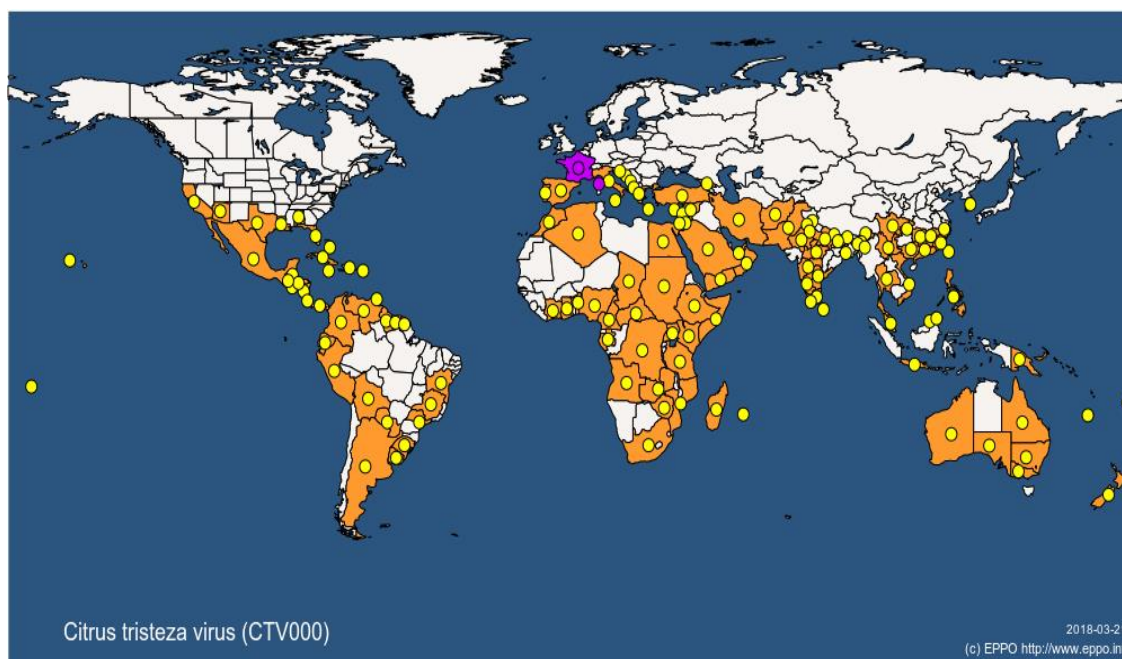
Pokazala se nažalost, uz osjetljive agrume, kao odlična podloga za daljnje rasprostranjivanje virusa CTV te razvoj sindroma brzog propadanja stabala, odgovornog za gubitak gotovo sto milijuna inficiranih stabala cijepljenih na gorku naranču u Južnoj Americi, Sjedinjenim Državama i Španjolskoj. Prve epidemija zabilježena je 1930. godine u Argentini, 1937. godine u Brazilu, zbog čega je bolest dobila ime tristeza, što na portugalskom znači tuga (Moreno i sur. 2008, Bar-Joseph i sur. 1989). Dvije godine kasnije, 1939. godine, tristeza se pojavila u Kaliforniji, 1951. na Floridi, 1957. u Španjolskoj i 1980. u Venezueli. Do 2008. godine, zabilježeno je i nekoliko epidemija manjeg opsega na Cipru, u Meksiku, Dominikanskoj Republici i Italiji (Moreno i sur. 2008). Na području Australije i Južnoafričke Republike virus je bio prisutan nešto ranije i brza pojava bolesti je onemogućila daljnje cijepljenje na gorku naranču (Webber 1943). I pored upotrebe novih podloga, tolerantnijih na infekciju virusom CTV, to nije prošlo bez troškova, jer su nove podloge imale manje poželjne hortikulture karakteristike, bile su manje produktivne i podložne drugim bolestima (Dawson i sur. 2015). Ubrzo su se pojavili simptomi jamičavosti drva koja uzrokuje manje, ali značajne ekonomske štete.

Uzrok bolesti tristeza nije bio poznat u vrijeme dok je trajala epidemija brzog propadanja i smrti stabala (Dawson i sur. 2015). Dokazano je da je bolest uzrokovana patogenom čiji je vektor lisna uš, da je značajan prijenos cijepljenjem, a kasnije je dokazano da su epidemije povezane s virusima sličnim česticama (Fawcett i sur. 1946, Meneghini 1946,). Meneghini je 1946. godine eksperimentalno dokazao da lisne uši prijenose ovu infekciju i da ih uzrokuje virus veličine od 2000×10^{-12} nm (Bar-Joseph i sur. 1989). Razvoj metoda mehaničke inokulacije izoliranih viriona pokazala je da su ove neuobičajeno dugačke čestice uzrokovale bolest propadanja (Garnsey i sur. 1977, Garnsey i Muller 1988). Pročišćavanjem dugih viriona stvoren je antiserum te je uslijedio razvoj različitih seroloških postupaka detekcije (Bar-Joseph i sur. 1972, Bar-Joseph i sur. 1979, Brlansky i sur. 1984, Brlansky i sur. 1988, Cambra i sur 1991, Garnsey i sur. 1979, Garnsey i sur. 1993).

Razaranje uzrokovano bolešću brzog propadanja praćeno je pojavom novog fenotipa bolesti koja uzrokuje sindrom jamičavosti drva (McClean i sur. 1955, Muller i sur. 1968). Ova bolest ne ubija drveće, ali dovodi do kržljanja i smanjenog prinosa slatke naranče i grejpfruta na svim podlogama (Dawson i sur. 2015). S virusom CTV povezuje se i sindrom žutice sjemenjaka (seedling yellows) koji se javlja kod sadnica gorke naranče, grejpfruta i limuna (McClean i Van der Plank 1955). Smatra se da je danas svako uzgojno područje agruma u svijetu potencijalno ozbiljno ugroženo bolešću tristeza.

1.1.4. Geografska distribucija

CTV je široko rasprostranjen u svim područjima u kojima rastu agrumi (Dolja i sur. 2006). U Europi je prisutnost virusa CTV najznačajnija na području Mediterana (Bar-Joseph i sur. 1989). Virus je detektiran je u Turskoj, Španjolskoj, Izraelu, Francuskoj i drugim uzgojnim područjima (slika 1). CTV je u Hrvatskoj je prvi put dokazan 1986. godine u plemkama mandarine unšiu, *C. unshiu* (Davino i Catara 1986), komercijalno najinteresantnije vrste u našim uzgojnim uvjetima. Serološke analize provedene 1990. godine potvrdile su visoku učestalost inficiranosti stabala iz matičnog nasada agruma (Šarić i Dulić 1990). Većina agruma u Hrvatskoj je cijepljena na podlogu *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., zbog čega je infekcija uglavnom asimptomatska, pa se virus nesmetano rasprostranjivao u sva uzgojna područja južne i srednje Dalmacije razmjenom i cijepljenjem inficiranog materijala (Černi 2009). Uvjeti koji su bili prisutni na našem području (pojava smeđe uši agruma, blagi CTV genotipovi, cijepljenje na podloge koje su osjetljive na infekciju, potencijalno velika varijabilnost hrvatskih CTV izolata) pogodovali su rasprostranjivanju virusa i procjena je da bi virusne varijante prisutne na našim prostorima mogle predstavljati ozbiljnu prijetnju nasadima agruma u mediteranskim zemljama.



Slika 1. Geografska distribucija virusa CTV. Izvor: Europska i mediteranska organizacija za zaštitu bilja (the European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO).

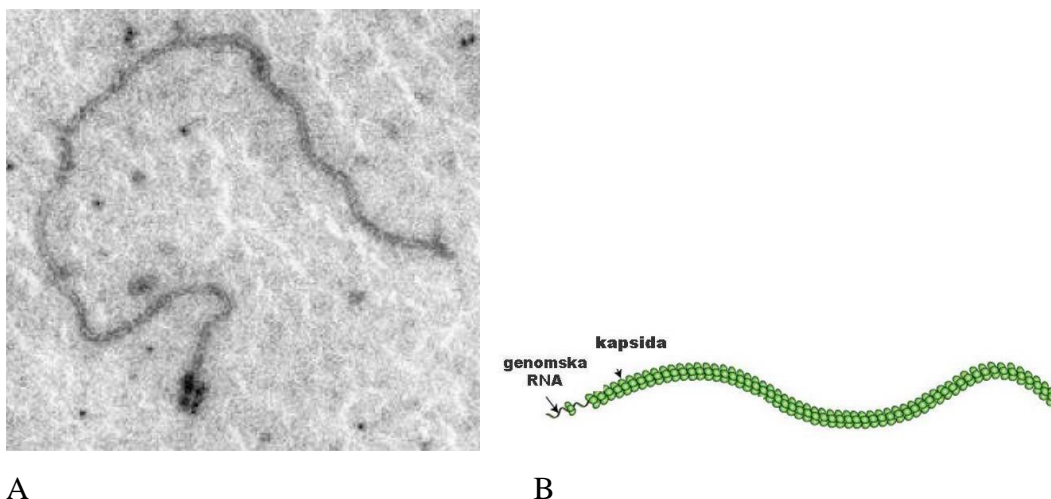
Posljednji put ažurirano: 28.02.2018. (<https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/distribution>)

1.1.5. Rasprostranjivanje virusa

Nekoliko vrsta uši prenosi virus horizontalno na semiperzistentan način, zbog čega kemijska kontrola lisnih uši značajno ne mijenja stopu širenja virusa CTV (Gottwald i sur. 2002). Stjecanje virusa ušima traje od 30 min do 24 sata, nakon čega uš može virus rasprostranjivati 1-2 dana. Najefikasniji vektor je *Toxoptera citricida* (Raccach i sur. 1976, Hermoso de Mendoza i sur. 1984, Rocha-Pena i sur. 1995). Neke genotipove virusa određene vrste uši prenose mnogo efikasnije od drugih (Hermoso de Mendoza i sur. 1988). Prijenos kroz uši ponekad mijenja populaciju virusnih genomskih varijanti (Bar-Joseph i sur. 1983). Brojnost populacija uši i njihovih vrsta koje su specifične za svaki regiju su kritični faktori u epidemiologiji virusa CTV (Garnsey i Muller 1988). Ipak, veći broj uši na biljkama ne znači i efikasniji prenos. Tako *Aphis gossypii* koji nije toliko brojan na citrusima je efikasniji vektor mnogih izolata, dok su *Aphis citricola* i *Tokoptera aurantii* manje efikasni vektori, ali su brojniji na biljkama (Bar-Joseph i sur. 1989, Ambros i sur. 2011). Vertikalno se CTV rasprostranjuje vegetativnim cijepljenjem kada se podloga cijepi zaraženim pupom (Dawson i sur. 2015). Ovo je najčešći način primarne infekcije virusom CTV. U laboratorijskim uvjetima CTV se može mehanički prenijeti na način da se kora stabljike zasjeca nožem uronjenim u ekstrakt virusa (Dawson i sur. 2015, Ambros i sur. 2013). Dokazano je da se izolat T36 može eksperimentalno, mehanički te agroinokulacijom prenijeti i na vrstu *Nicotiana benthamiana* (Harper 2013, Mawassi i sur. 1995).

1.1.6. Morfološke karakteristike

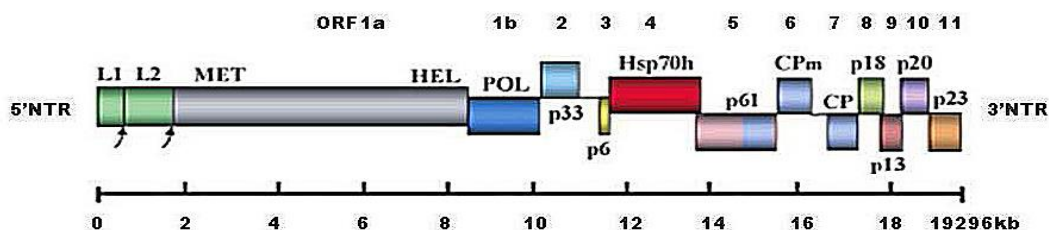
Filamentozni izgled čestica virusa CTV je opisan 1963. godine (Bar-Joseph i sur. 1979, Karasev 2000, Kitajima i sur. 1963, Agranovsky 1996, Dolja i sur. 2006). Dugački fleksibilni virioni, dimenzija 2000 nm x 11 nm, spiralnog oblika (slika 2), ima dva kapsidna proteina, koja čini oko 6% mase viriona (Bar-Joseph i sur. 1979, Dawson i sur. 2015). Glavni kapsidni protein (CP), mase 25 kDa, obavlja 97% virusne čestice, dok sporedni kapsidni protein (CPm), mase 27 kDa, inkapsulira 5' terminalne nukleotide (Satyanarayana i sur. 2004). Zbog polarne morfologije, čestice virusa CTV podsjećaju na oblik zmije čegrtuše (Bar-Joseph i sur. 1972). Svaki zavoj sastavljen je od 8,5 do 10 proteinskih podjedinica, a visina svakog zavoja je 3,5 do 3,7 nm (Lu i sur. 2004).



Slika 2. (A) Elektronskomikroskopska snimka čestice virusa tristeza (preuzeto iz Niblett i sur. 2000).
(B) Shematski prikaz čestice virusa tristeza (prerađeno prema shemi preuzetoj sa stranice <http://www.expasy.org/viralzone/>).

1.1.7. Genom i replikacija virusa

Jednolančani 19.3-kb dug RNA-genom podijeljen je na dvanaest otvorenih okvira čitanja, ORF-ova (*open reading frames*, ORFs) i 2 netranslatirajuće terminalne regije (5'- i 3' NTR) (Dawson i sur. 2015) (slika 3). ORF 1a kodira poliprotein od 349-kDa koji sadrži dvije proteazne domene plus metiltransferaznu i helikaznu domenu. Translacija genomske RNA povremeno se nastavlja u polimeraznu (ORF 1b) domenu pomoću +1 pomaka okvira čitanja. Domene ORF 1a i 1b te NTR su sve što je potrebno za replikaciju virusa CTV u protoplastima. Deset 3' ORF-ova se eksprimiraju pomoću 3'- subgenomskih RNA. Geni smješteni u ovim regijama kodiraju proteine koji su uključeni u rasprostranjivanje virusa te interakcije s vektorima i domaćinima. Pored CP i CPm, proteini p65 (hsp70 homolog) i p61 su potrebni za efikasno sastavljanje viriona. Protein p6 je potreban za infekciju biljaka, kao i proteini p20 i p23, koji su zajedno s proteinom CP supresori specifičnog obrambenog odgovora domaćina (RNA silencing) (Dawson i sur. 2015, Dawson i Folimonova 2013).



Slika 3. Shematski prikaz organizacije CTV-genoma. Obojeni pravokutnici predstavljaju otvorene okvire čitanja (*open reading frames*, ORFs) numerirane 1-11. Veličina genoma prikazana je u kilobazama (kb) skalom ispod sheme (Dolja i sur. 2006).

Razvoj infektivnih cDNA-klonova virusa CTV omogućio je manipulaciju genomom, istraživanje replikacije i strategija ekspresije gena, a označavanje virusa zelenim fluorescentnim protein (GFP) proučavanje rasprostranjivanja i distribucije u različitim biljkama (Hajeri i sur. 2014, Satyanarayana i sur 1999, Baruah i sur. 2015).

Unutar biljke, virusi prelaze iz zaraženih stanica u nezaražene stanice pomoću dva različita mehanizma: stanica-u-stanicu i kretanje na daljinu (Dawson i sur. 2015). U prvom, proteini za transport sudjeluju u transportu plazmodezmijama domaćina čime virus prelazi iz stanice u stanicu. Kod transporta na veće udaljenosti, virusi ulaze u elemente floema, koji služi za stalno kretanje asimilata po cijeloj biljci. Virus se tako prenosi na udaljenost od nekoliko stanica do nekoliko metara u bilo kom smjeru, nakon čega izlazi iz floema u sljedeću stanicu i nastavlja kretanje iz stanice u stanicu. Virus CTV predstavlja idealan sustav za istraživanje kretanja na daljinu (Dawson i sur. 2015). Njegovo kretanje u agrumima sastoji se gotovo isključivo od kretanja na daljinu s ograničenim kretanjem iz stanice u stanicu.

1.1.8. Virusni genotipovi

CTV je virus čija se replikacija povezuje s floemom različitih vrsta agruma, sadrži monopartitni RNA-genom pozitivnog smisla, inkapsuliran je sa dva različita kapsidna proteina i prenosi ga nekoliko vrsta lisnih uši (Harper i sur 2014). Ekološka niša ograničena mu je na floem agruma i ima jedan od najvećih i najkompleksnijih genoma među biljnim virusima, replikativni ciklus virusa CTV ovisi o višestrukim interakcijama s domaćinom (Dawson i sur. 2015, Harper i sur 2014).

Na temelju sličnosti sekvenci genoma, različiti izolati virusa CTV dijele se u 7 grupa koje su definirane kao genotipovi (Guerri i sur. 1991). Iako većina genotipova sadrži izolate

među kojima se može naći čitav spektar fenotipova (uzrokuju različite simptome), genotip nije uvijek vezan za određenu fenotipsku karakteristiku (Dawson i sur. 2015). Genotipovi su označeni kao T36, VT, T3, RB, T68, T30 i HA16-5. Unutar grupe, svi članovi imaju identičnu organizaciju genoma i zajedničko podrijetlo. Podrijetlo nekih genotipova nije poznato. Prenošenjem citrusa i virusa CTV širom svijeta, došlo je do miješanja različitih genotipova na različitim domaćinima, dovodeći do rekombinacija i selekcije koje su doveli do diferencijacije današnjih populacija virusa CTV. U prirodnim uvjetima, agrumi su često zaraženi sa više različitih virusnih genotipova. Neke populacije su mješavine dva ili tri genotipa u relativno sličnim odnosima, dok druge imaju jedan ili dva dominantna genotipa i manji postotak drugih (Dawson i sur. 2015, Martin i sur. 2009). S obzirom da je dokazana rekombinacija između različitih sekvenci različitih genotipova, moguće je da više virusnih genotipova na istom domaćinu zaražavaju istovremeno iste stanice (Folimonova i sur. 2010, Gottwald i sur. 1996).

1.1.9. Virusni fenotip

Različiti izolati virusa CTV mogu izazivati simptome različitog tipa i intenziteta na različitim domaćinima, tzv. virusni fenotip (Schneider 1959). Ovaj virus pokazuje izuzetnu raznolikost fenotipova u usporedbi sa drugim virusima, doslovno na stotine različitih fenotipova (Dawson i sur. 2015). Iz tog je razloga virus CTV vrlo je pogodan za istraživanja mehanizama razvoja bolesti. Djelovanjem najmanje tri virusna proteina (CP, p23 i p20) dolazi do supresije specifičnog obrambenog odgovora domaćina (Fraser 1952). Ovisno o vrsti podloge i plemke, može se javiti širok spektar intenziteta karakterističnih simptoma, od jakih do blagih, pa i do potpunog nedostatka simptoma.

Glavni sindromi koji uzrokuju značajne ekonomske štete su (Dawson i sur. 2015, Raccach i sur. 1976):

- a) Tristeza ili brzo propadanje i smrt stabla (*Quick Decline sindrom*)
- b) Jamičavost drva uz kržljanje i smanjen prinos (*Stem Pitting sindrom*)
- c) Žutica sjemenjaka (*Seedling Yellows sindrom*)
- d) Prosvjetljenje ili oplutnjavanje lisnih žila (*Vein Clearing* ili *Corking sindrom*)

Najčešći sindrom izazvan virusom CTV je potpuni nedostatak simptoma. Određeni genotipovi virusa CTV mogu u većini sorti agruma izazvati asimptomatsku infekciju (Harper i sur. 2014). Blagi genotipovi virusa CTV koji se razmnožavaju na gorkim narančama, čak i kada se repliciraju u visokom titru mogu izazvati asimptomatsku bolest.

U određenim domaćinima, čak i izolati koji inače uzrokuju jake simptome, mogu ne proizvesti simptome (na primjer, T385 iz Španjolske, T30 iz Floride i K iz Korzike) (Dawson i sur. 2015, Sekiya i sur. 1991). Najtolerantniji domaćini su mandarine koji ostaju bez simptoma kod većine CTV izolata, čak i onih koji izazivaju brzo propadanje stabla i jamičavost kod drugih domaćina (Dawson i sur. 2015).

1.1.9.1. Sindrom brzog propadanja i smrti stabla

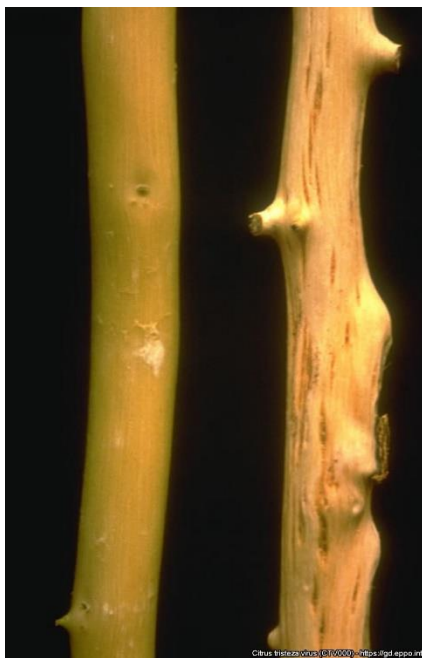
Sindrom brzog propadanja i smrti stabala (bolest tristeza u užem smislu), rezultira brzim propadanjem i smrću brojnih komercijalno značajnih vrsta agruma kao što su *Citrus sinensis* (slatka naranča), *C. reticulate* (mandarina), *C. paradise* (grejpfrut), *Fortunella sp.* (kumkvat) i *C. aurantifolia* (lajm) kada su cijepljeni na podlogama *C. aurantium* (gorka naranča) ili *C. Limon (L.) Osbeck* (limun) (Moreno i sur. 2008, Dawson i sur. 2015, Harper i sur. 2014). Tijekom razvoja ovog sindroma, stanice sitastih cijevi i stanice pratilice kolabiraju i nekroziraju, stvarajući prekomjernu količinu nefunkcionalnog floema i prekomjerni rast izdanaka (Harper i sur. 2014, Mawassi i sur. 1993). Zbog nekroze floema smanjuje se protok ugljikohidrata do korjena, što dovodi do nedovoljnog snabdjevanja vodom i hranljivim tvarima (Dawson i sur. 2015). Zaraženo drvo pokazuje gubitak korjenske mase, zaustavljanje ili slab rast, odumiranje, klorozu listova, smanjenu veličinu ploda, gubitak listova, simptome deficita minerala i na kraju propada (slika 4). Vremenski period pojave smrti stabla obično je brži na drveću bogatom plodovima kada je potreba za vodom veća od sposobnosti korjenja za snabdjevanjem (Dawson i sur. 2015). Najčešće proces propadanja i smrti stabla teče sporo, po nekoliko godina i izraženiji je kod starijih stabala, dok mlađe biljke obično ostaju slabo razvijene.



Slika 4. Sindrom brzog propadanja stabla (QD, *quick decline*) na primjeru slatke naranče cijepljene na podlogu gorke naranče (preuzeto sa stranice <https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos>)

1.1.9.2. Jamičavost drva

Za jamičavost drva uzrokovanu virusom CTV, važna je infekcija određenim virusnim genotipom, ali i tip domaćina (Dawson i sur. 2015). Određeni izolat virusa, u čitavom spektru domaćina, može uzrokovati jamičavost u samo malom podskupu jedne vrste. Kada visoko virulentni genotipovi virusa CTV zaraze drveće komercijalne slatke naranče, limete i grejpufruta, bez obzira na korištenu podlogu, jamičavost utječe i na podlogu i na cijepljenu sortu (Moreno i sur. 2008, Harper i sur 2014). Ispod izoliranih, ulegnutih područja kore, jamičavost uzrokuje razvoj dubokih jamica u drvu biljke (slika 5), što kronično ograničava rast i razvoj agruma, izaziva značajnu redukciju snage biljke, izražen je patuljasti rast i nizak prinos voća neadekvatnog za tržište. Jamičavošću izazvan neprofitabilan rast različitih komercijalnih sorti agruma obično ne uzrokuje smrt stabla, već velike ekonomske gubitke (Dawson i sur. 2015, Harper i sur. 2014). Kambij zdravih i normalno razvijenih područja zaraženih stabala, koji se nalazi između floema i ksilema, se dijeli i diferencira u suprotnim horizontalnim pravcima, stvarajući novi ksilem na unutrašnjoj strani i novi floem na strani kore, i dovodi do povećanog opsega stabla i grana (Dawson i sur. 2015). Neke jame su dovoljno velike da se odmah mogu primjetiti, ali više štete je povezano sa postojanjem mnoštva malih jamica.



Slika 5. Simptomi jamičavosti drva na grančicama meksičke limete (lijevo zdrava biljka, desno biljka zaražena virusom CTV) (preuzeto sa stranice <https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos>).

1.1.9.3. Žutica sjemenjaka

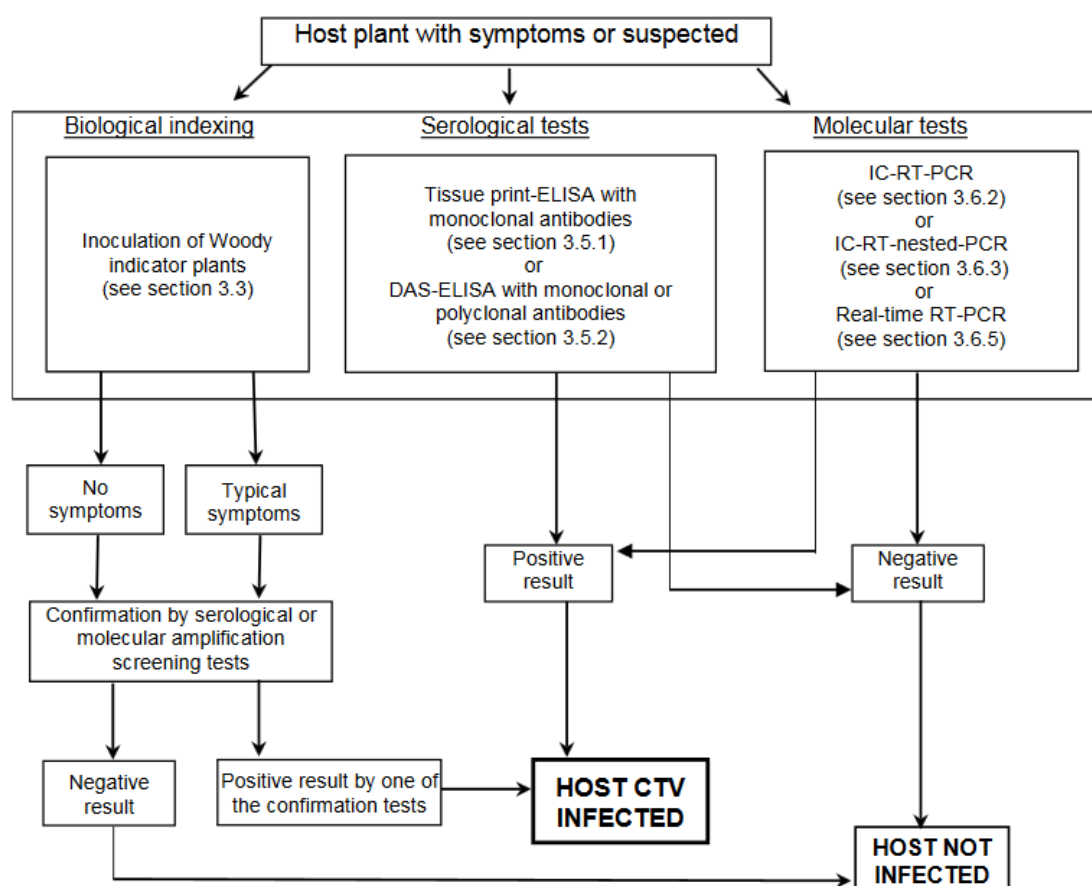
Kod mladih agruma obično se javlja žutica sjemenjaka, generalno u visokom postotku u staklenicima i kod vršno cijepljenih biljaka na terenu (Harper i sur. 2014, Wallace i Drake 1972). To dovodi do kržljanja, patuljastog rasta, kloroze listova, a ponekad i do potpunog prekida rasta sadnica s malim žutim ili čak bijelim listovima na gorkoj naranči, grejpfrutu i limunu (Dawson i sur. 2015, Harper i sur. 2014, Bove i sur. 1998). Poslije nekoliko mjeseci, drveće s manje teškim simptomima može nastaviti normalan rast. Izolati virusa iz oporavljenih biljaka izazivaju blaži oblik bolesti ili su bez simptoma kada se inokuliraju u indikatorske biljke (Vives i sur. 1999).

1.1.9.4. Prosvjetljenje ili oplutnjavanje lisne nervature

Prosvjetljenje lisne nervature povremeno se može videti na poljima, ali je česta karakteristika na koju se nailazi tijekom bioloških analiza CTV izolata u staklenicima (Dawson i sur. 2015). Meksička limeta je standardni domaćin za testiranje koji razvija ove simptome uz morfološke deformacije listova kao odgovoru na većinu CTV izolata. Intenzitet simptoma je veći kod mladih listova i smanjuje se kako ojačavaju. Intenzivno prosvjetljenje lisne nervature ponekad je praćeno oplutnjavanjem, smanjenjem veličine lista i žuticom cijelog lista.

1.1.10. Detekcija i karakterizacija

Detekcija i karakterizacija virusa CTV provode se biološkim, serološkim ili molekularnim testovima (Lu i sur. 2004). Često se kombinira više tehnika radi potvrde dijagnoze. Preporučene tehnike za rutinske biološke, serološke i molekularne testove su prikazane na slici 6 (Lu i sur. 2004).



Slika 6. Shema protokola za detekciju virusa CTV.

Izvor: Diagnostic protocols for regulated pests, Food and agriculture organisation.

(https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2017/01/DP_15_2016_En_2017-01-30.pdf)

Od 1951. godine, po otkriću da je bolest tristeza uzrokovana virusom, počela je potraga za najjednostavnijom metodom za dijagnozu virusa (Dawson i sur. 2015, Harper i sur 2014). Detekcija se temelji na različitim pristupima kao što su detekcija znakova virusne bolesti, mikroskopska struktura (svjetlosna i elektronska mikroskopija), prisustvo proteinskih antigena virusa nekom od seroloških metoda ili detekcija virusne RNA nekom od molekularnih tehnika.

Budući da glavni CP inkapsulira 95% genoma virusa CTV, upravo ovaj gen/protein često je korišten kao meta za detekciju virusa CTV te identifikaciju genotipa. (Mawassi i sur.

1993, Herrera-Isidró 2009). Budući da su geni za CP velikog broja izolata virusa CTV klonirani i sekvencirani, zabilježena je korelacija između geografskog podrijetla i bioloških karakteristika CTV izolata i sekvence genotipova njihovih kapsidnih proteina, pa se sekvenciranje i filogenetska analiza CP gena koristi za karakterizaciju novootkrivenih i biološki nekarakteriziranih CTV izolata (Herrera-Isidró 2009, Niblett i sur. 2000, Nolasco i sur. 2009, Wallace 1968, Garnsey i sur. 1987).

1.1.10.1. Biološko testiranje

Biološko indeksiranje je vrsta biološkog testiranja koje se često koristi, jer se smatra osjetljivom i pouzdanom metodom za otkrivanje novog ili neuobičajenog fenotipa virusa (Lu i sur. 2004). Simptomi izolata CTV se eksperimentalno prenose na standardizirani skup agrumskih indikatorskih biljaka (Wallace i Drake 1951, Roistacher 1976). Kao prva metoda detekcije, korištena je upravo ova metoda, a virus je prenesen na sadnicu Meksičke limete (*Citrus aurantifolia*) od strane Wallace i Drake (1951) (Al-Senan i sur. 1997). Meksička limeta univerzalni je indikator koji razvija karakteristične simptome u roku od 2-6 mjeseci kada je inkubiran u stakleniku s kontroliranom temperaturom od 18-25°C. Simptomi na lišću počinju kao prosvjetljenje lisnih žila i oplutnjavanje, koje zatim prate kloroza i deformacije listova (Bar-Joseph i sur. 1974). Određeni genotipovi virusa CTV mogu dovesti do zaostajanja u rastu i jamičavosti stabla.

Metoda je vrlo osjetljiva i specifična. Upotreba indikatorskih biljaka nezamjenjiva je u fenotipskoj karakterizaciji CTV genotipova (Hilf i sur. 2005).

1.1.10.2. Serološka detekcija

Razvojem metoda za purifikaciju virusa CTV, razvijene su i brže i preciznije tehnike njegove serološke/imunokemijske detekcije (Cambra i sur. 2002). Najčešće je korištena serološka imunoenzimska tehnika (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), a temelji se na sposobnosti antitijela da prepoznaju i vežu se na specifičan antigen određenog patogena (Čevik i sur. 2013). Osobito veliku specifičnost daje primjena monoklonskih antitijela. Pomoću monoklonskih antitijela, moguće je u laboratorijskim uvjetima detektirati različite izolate virusa CTV bez reakcije s komponentama biljke domaćina. Proizvodnjom monoklonskih antitijela specifičnih za CTV riješen je problem dijagnostičke (ne)specifičnosti poliklonskih antitijela i time povećana dijagnostičku osjetljivost seroloških testova (Lu i sur. 2004). Mješavinom monoklonskih antitijela moguće je detektirati sve CTV izolate koji su

testirani iz različitih međunarodnih kolekcija. Postoje i dalje se razvijaju različite varijante ELISA testa (Ruiz-García i sur. 2005), a najčešće primjenjivana izvedba je tzv. DAS-ELISA koja koristi dva puta antitijelo (eng. *Double Antibody Sandwich*, DAS-ELISA) (Lu i sur. 2004, Čevik i sur. 2013). Rezultat se smatra negativnim ako je srednja vrijednost optičke gustoće (OD) duplikata istog uzorka $\geq 2 \times$ OD vrednosti negativne kontrole zdravih biljnih ekstrakata (Lu i sur. 2004). Stopa podudarnosti seroloških testova dostiže oko 98,5%, što je usporedivo s rezultatima molekularne detekcije.

Drugi često korišten serološki test u detekciji virusa CTV je test direktnog otiska tkiva, *Direct tissue blot immunoassay*, tzv. DTBIA-test. Temelji se na korištenju specifičnih antitijela koja se nanose na membrane na koje je prethodno otisnuto tkivo uzorka koji se testira, dok se ostatak procedure provodi slično klasičnom ELISA-testu. Ova metoda je korisna za analizu velikog broja uzoraka iz nasada agruma, uglavnom zahvaljujući jednostavnosti procedure i pripreme uzoraka.

1.1.10.3. Molekularna detekcija i karakterizacija

Molekularne tehnike obuhvaćaju različite pristupe. Najčešće se primjenjuju izvedbe PCR-reakcije kojima se ciljano umnožava određeni dio virusnog genoma. Lančanoj reakciji polimerazom (PCR) zbog detekcije virusnog RNA-genoma prethodi reverzna transkripcija (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Izvedbi IC/RT-PCR (eng. *Immunocapture RT-PCR*) kod umnožavanja ciljanih fragmenata RT-PCR metodom prethodi vezanje virusa na podlogu specifičnim antitijelima, dok kvantitativni PCR (qPCR) omogućuje točnu kvantifikaciju virusnog genoma. Za karakterizaciju virusnih varijanti koriste se analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (eng. *Single-Strand Conformation Polymorphism*, SSCP) i analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (eng. *Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (Rubio i sur. 1996, Narvaez i sur. 2000, Gillings i sur. 1993, Rocha-Peña i Lee 1991, Liu i sur. 2016) te utvrđivanje slijeda nukleotida metodom sekvenciranja nakon čega slijedi filogenetska analiza i genotipizacija izolata.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je provjeriti prisutnost virusa tristeza u 46 uzoraka indikatorskih biljaka agruma standardnom metodom ELISA te ispitati hoće li modifikacija standardnog postupka detekcije dati jednako pouzdane rezultate.

Ciljevi istraživanja:

1. Primjenom standardne metode ELISA provjeriti prisutnost virusa tristeza u indikatorskim biljkama agruma sedam godina nakon ciljane inokulacije različitim genotipovima virusa tristeza.
2. Usporediti stopu sedmogodišnjeg „preživljenja“ različitih virusnih genotipova pod utjecajem nepovoljnih okolišnih čimbenika (hladne zime, mraz, izrazite vrućine, suša).
3. Ispitati mogućnost primjene modificirane metode ELISA, primjenom poprečnih prereza mladih izboja (drvo s floemom), te usporedba osjetljivosti ovog pristupa u odnosu na standardni ELISA-protokol koji koristi floemski ekstrakt.
4. Ispitati mogućnost primjene modificirane metode ELISA, primjenom poprečnih prereza mladih izboja bez floemskog dijela (samo drvo), u detekciji virusnih genotipova koji uzrokuju simptome jamičavosti drva zaražene biljke.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorak

Uzorci korišteni u istraživanju uzeti su s indikatorskih biljaka vrste meksička limeta (*Citrus aurantifolia*), uzgojenih na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu u svrhu ranijeg istraživanja bioloških karakteristika virusa CTV (Hančević 2009). Biljke su 2008. godine zaražene različitim genotipovima virusa CTV, svim opisanim genotipovima, metodom inokulacije zaraženim pupovima. Podrijetlo zaraženih pupova te filogenetska pripadnost virusa prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike i podrijetlo virusnih izolata korištenih za inokulaciju biljaka meksičke limete (Hančević 2009)

Oznaka virusnog izolata	Pripadnost filogenetskoj skupini (Gp)	Podrijetlo	Plemka/podloga na kojima se čuvaju virusni izolati u kolekciji	Lokacija kolekcije
3	1	Albanija	Limun Mayer / gorka naranča	MAIB, Italija
32	3b	Italija	Limun Mayer/ gorka naranča	
57	4	Egipat	Limun / citranž Troyer	
2	5	otočje Madeira	Limun / citranž Troyer	Sveučilište Algarve, Portugal
8	3a	otočje Madeira	Limun / citranž Troyer	
176	M	Španjolska	Limun / citranž Troyer	
440	2	Hrvatska	Limun / citranž Troyer	

Uspješnost inokulacije je kod svih indikatorskih biljaka 2008. godine potvrđena metodom ELISA (Hančević 2009). Do ovog istraživanja 2015. godine, biljke su uglavnom čuvane u stakleniku, no u više su navrata okolišni uvjeti, izuzetno vruća ljeta i hladne zime, bili nepovoljni za replikaciju virusa.

Tablica 2. Opis uzoraka s pripadnošću filogenetskoj grupi virusa i njenim prosječnim potencijalom za razvoj simptoma jamičavosti drva (u zagradi) te uočeni simptomi jamičavosti drva (0-bez simptoma, 3-najintenzivniji simptomi)

Oznaka uzorka (n = 46)	Filogenetska grupa	Simptomi jamičavosti drva (SP)
10, Q3-2	1 (SP 1,5/3)	0
15, Q3-1		0
16, Q3-1		1
29, Q3-2		0
33, Q3-1		1
42, Q3-2		0
11, 440-1	2 (SP 2,5/3)	0
19, 440-2		0
37, 440-2		0
44, 440-2		0
46, 440		0
4, 8-2	3a (SP 2,5/3)	1
9, 8-1		0
21, 8-2		1
28, 8-2		3
36, 8-1		2
8-1, 8		0
5, Q57	4 (SP 3/3)	1
23, Q57		2
35, Q57		3
38, Q57		3
48, Q57		3
1, 32-2	3b + 5 (SP 3/3)	3
8, 32-2		3
13, 32-2		3
30, 32-1		0
41, 32-1		2
12, 176-2	M (SP 0)	0
18, 176-1		0
25, 176-1		0
40, 176-1		0
47, 176		0
6, 2-2	5 (SP 0)	0
43, 2-2		0
3, neg.kont.	Kontrola	0
22, neg.kont.		0
27, neg.kont.		0
45, neg.kont.		0
1i, C.wilsonii 3	--	0
2i, C.wilsonii 4		2
3i, C.wilsonii 5		0
4i, C.wilsonii 6		3
5i, C.wilsonii 7		0
6i, C.wilsonii 8		0
7i, C.wilsonii 7		2
8i, C.wilsonii 8		1

Uzorkovanje biljnog materijala (tablica 2) za potrebe diplomskog rada provedeno je na ukupno 38 biljaka meksičke limete iz kolekcije u Splitu, a kao kontrolna skupina u istraživanje je uključeno i 8 biljaka vrste *Citrus wilsonii* uzete iz staklenika Zavoda za mikrobiologiju PMF-a, što je ukupno činilo 46 biljaka. Biljke vrste *Citrus wilsonii* pokazivale su simptome zaraze virusom CTV, no kod njih prisutnost virusa ranije nije bila dokazana, niti je virus bio molekularno karakteriziran.

Kod svih uzoraka dezinficiranim škarama uzeto je po 2-3 grančice, debljine 0.5-1 cm i duljine 10-20 cm. Grančice su bili mladi izbojci sa zelenom korom sa kojih je naknadno skinuto lišće (slika 7).



Slika 7. Mladi izbojci agruma sa zelenom korom korišteni pri uzorkovanju.

Uzorci uzeti u Splitu su u kratkom vremenskom periodu pažljivo transportirani u Zagreb zaštićeni u plastičnim vrećicama. Sa svih uzoraka grana prvo su priređeni poprečni prerezi debljine 3mm sa grančica koje su sadržavale zelenu koru. Za pripremu prereza korišten je rezač za papir (slika 8) čija oštrica i podloga su bili svaki puta očišćeni i dezinficirani radi izbjegavanja kontaminacije.



Slika 8. Rezač papira korišten za pripremu prereza grančica iste debljine.

Sa svakog uzorka napravljena su po 3 prereza sa korom, a zatim su grančice oguljene (odstranjena je zelena kora, tj. floemsko tkivo). Oguljena zelena kora korištena je za pripremu homogenata za standardni postupak detekcije virusa metodom ELISA. Potom su oguljen grančice vizualno pregledane na prisutnost simptoma jamičavosti drva koji se karakteristično javljaju na drvu grančice, a čiji je intenzitet bio vrednovan od 0-bez simptoma do 3-visoki intenzitet prema shemi opisanoj u tablici 3. Potom su i sa oguljenih grančica napravljena po 3 poprečna prereza opisanim postupkom.

Tablica 3. Shema za procjenu intenziteta simptoma jamičavosti drva (SP)

Intenzitet simptoma	Broj jamica na 10cm drva biljke
0 (bez simptoma)	0
1 (blag)	0 - 25
2 (srednji)	25 - 100
3 (jak)	> 100

3.2 Serološka detekcija metodom ELISA

Serološka detekcija metodom ELISA provedena je korištenjem komercijalnog kompleta reagensa proizvođača *LOEWE Biochemica (Citrus tristeza virus Complete Kits / 96*, kataloški broj 07099C/096). Komplet reagensa sadržavao je sve potrebne reagense (primarna poliklonska protutijela iz zeca, protutijela konjugirana alkalnom fosfatazom, ekstrakcijski pufer, pufer za ispiranje, konjugacijski pufer, supstrat p-nitrofenilfosfat, pufer za pripremu supstrata pozitivnu i negativnu kontrolu te potrebne mikrotitarske pločice. Sastav navedenih

pufera opisan je u tablici 4. Proizvodi su držani u hladnjaku (oko 4°C) prema uputama proizvođača.

Tablica 4. Sastav pufera sadržanih u komercijalnom kompletu reagensa za detekciju virusa CTV metodom ELISA

Pufer	Komponente
Pufer za vezanje primarnih protutijela	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃
Pufer za ispiranje	NaCl Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O KH ₂ PO ₄ KCl Tween 20
Konjugat/Pufer za ekstrakciju i pripremu konjugiranih protutijela	polivinil pirolidon (K10-K40) goveđi serum albumin NaN ₃
Pufer za pripremu supstrata	dietanolamin MgCl ₂ x 6 H ₂ O

Procedura detekcije virusa CTV metodom ELISA provedena je koristeći dva pristupa: klasični iz homogeniranog floemskog tkiva (zelena kora) i modificirani (izravno iz poprečnih prereza sa i bez kore, a bez prethodnog homogeniranja). Koraci pri testiranju su prikazani u tablici 5. Prvi je korak bio je vezanje antigen-specifičnih antitijela (IgG) na jažice mikrotitarske pločice. Slijedio je dodavanje uzorka koji potencijalo sadrži antigen, antigen se vezuje za imobilizirani IgG, formirajući kompleks antigen-protutijelo. Na nastali kompleks veže se sekundarno protutijelo konjugirano enzimom alkalna fosfataza (IgG-AP). Nakon dodatka supstrata p-nitrofenilfosfat alkalna fosfataza (AP) ga razgrađuje do p-nitrofenola koji je žuto obojen u slučaju pozitivne serološke reakcije. Razvoj ove boje primjetan je vizualno, ali je intenzitet obojenja mjeren instrumentalno pri 405 nm u uređaju fluorimetru *FLUOstar optima microplate Reader (BMG LABTECH)* nakon 1 i 2 sata od dodatka supstrata. Nakon svakog koraka inkubacije, reagensi se uklanjaju pomoću pufera za ispiranje tijekom više koraka (200 µL po svakom koraku ispiranja).

Tablica 5. Koraci u serološkoj detekciji virusa CTV metodom ELISA

Korak	Razrjeđenj e reagensa	Količin a po jažici	Inkubacij a	Temperatur a	Ispiranj e
1.Vezanje primarnog protutitijela (IgG) za oblaganje	Razrijediti IgG u omjeru 1:200 u puferu	0.2 ml	4h	37°C	4x
2.Dodavanje uzorka (200 µL ekstrakta ili 200 µL ekstrakcijskog pufera na prerez grančice/modifikacija)	Razrijediti uzorke u omjeru 1:20 u puferu	0.2 ml	preko noći	4°C	4x
3.Vezanje sekundarnog protutijela konjugiranog alkalnom-fosfatazom	Razrijediti protutijela u omjeru 1:200 u puferu	0.2 ml	4h	37°C	4x
4.Dodatak supstrata	Otopina supstrata 200 µL	0.2 ml	1h	sobna	-

Pri klasičnom postupku, uzorci zelene kore su homogenizirani u sterilnom tarioniku uz dodatak ekstrakcijskog pufera, dok su kod modificiranog pristupa prerezi direktno stavljeni u jažice na mikrotitarskim pločama, te im je dodan ekstrakcijski pufer.

Svaki je uzorak testiran u triplikatu (3 ekstrakta, 3 prereza s floemom i 3 prereza bez floema). ELISA pozitivne i negativne kontrole su, također, testirane u triplikatu u obliku ekstrakata. Pozitivnim reakcijama smatrani su uzorci čije su vrijednosti minimalno tri puta veće od negativne kontrole.

4. REZULTATI

4.1. Detekcija virusa CTV standardnim ELISA-testom

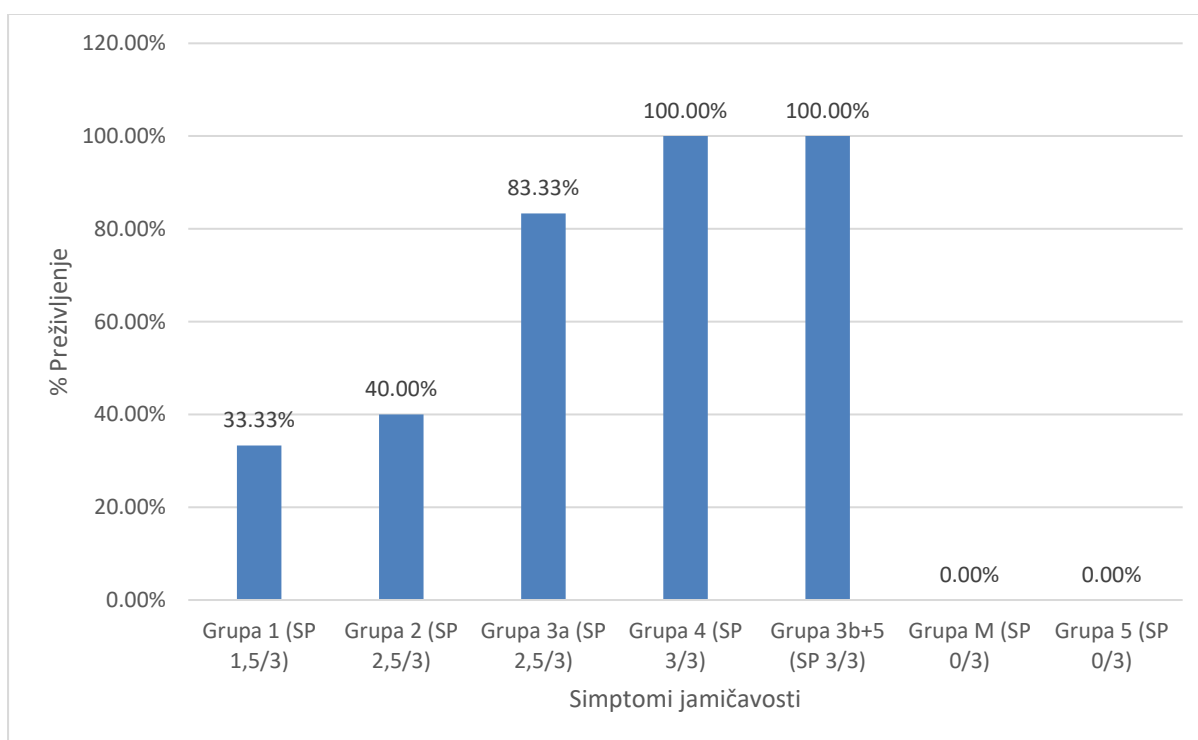
Ispitani uzorak činio biljni materijal uzet sa ukupno 46 biljaka. Biljke meksičke limete uspješno su zaražene virusom CTV 2008. Godine, dok za biljke vrste *Citrus wilsonii* prisutnost virusa nije bila dokazana. Standardni pristup detekcije metodom ELISA korištenjem ekstrakata floemskog tkiva dao je rezultate prikazane u tablici 6.

Ukoliko promatramo distribuciju virusa tristeza u indikatorskim vrstama agruma primjenom standardnog postupka detekcije virusa CTV metodom ELISA korištenjem izoliranog i homogeniziranog floemskog tkiva zaražene biljke (negativna reakcija ELISA testa, pozitivna reakcija ELISA testa) od ukupnog broja ispitivanog uzorka (46), njih 47,8% (22) nije bilo zaraženo visusom tristeza, dok je njih 52,2% (24) pokazivalo pozitivnu reakciju, odnosno bilo je zaraženo virusom CTV sedam godina nakon zaražavanja (tablica 6).

Tablica 6. Rezultati detekcije virusa CTV standardnim ELISA-pristupom koristeći ekstrakte floema te modificiranim pristupom koristeći poprečne prereze sa i bez floema.

Filogenetska pripadnost virusa CTV (intenzitet simptoma jamičavosti drva)	Šifra uzorka	ELISA ekstrakt	ELISA prerez s floemom	ELISA prerez bez floema	Simptomi jamičavosti drva
1 (SP 1,5/3)	10	-	-	-	0
	15	-	-	-	0
	16	+	+	+	1
	29	-	-	-	0
	33	+	+	+	1
	42	-	-	-	0
2 (SP 2,5/3)	11	+	+	+	0
	19	-	-	-	0
	37	-	-	-	0
	44	+	+	+	0
	46	-	-	-	0
3a (SP 2,5/3)	4	+	+	+	1
	9	-	-	-	0
	21	+	+	+	1
	28	+	+	-	3
	36	+	+	+	2
	8-1	+	+	+	0
4 (SP 3/3)	5	+	+	+	1
	23	+	+	+	2
	35	+	+	+	3
	38	+	+	+	3
	48	+	+	+	3
3b + 5 (SP 3/3)	1	+	+	-	3
	8	+	+	+	3
	13	+	+	+	3
	30	+	+	+	0
	41	+	+	+	2
M (SP 0)	12	-	-	-	0
	18	-	-	-	0
	25	-	-	-	0
	40	-	-	-	0
	47	-	-	-	0
5 (SP 0)	6	-	-	-	0
	43	-	-	-	0
NEG. KONT.	3	-	-	-	0
	22	-	-	-	0
	27	-	-	-	0
	45	-	-	-	0
<i>C. wilsonii</i>	1i	-	-	-	0
	2i	+	+	-	2
	3i	-	-	-	0
	4i	+	+	-	3
	5i	+	-	-	0
	6i	-	-	-	0
	7i	+	+	+	2
	8i	+	+	+	1

Usporedba sedmogodišnjeg preživljenja razlikovala se kod uzoraka inicijalno zaraženih različitim virusnim genotipovima (tablica 6). Tako su virusni genotipovi s najvišim potencijalom razvoja simptoma jamičavosti drva (filogenetske grupe 4 te kombinacija grupa 5 i 3b) pokazali 100%-tno “preživljenje”. Grupe s nešto manjim potencijalom razvoja simptoma jamičavosti drva (filogenetske grupe 3a i 2) pokazale su manje sedmogodišnje “preživljenje” (83,33% i 40%). Grupa 1 s najmanjim opisanim potencijalom za razvoj simptoma jamičavosti drva dala je “preživljenje” od 33,3%, dok je u grupama koje ne uzrokuju ovaj tip simptoma (5 i M) “preživljenje” bilo 0%. . Uočena je korelacija između simptoma jamičavosti drva i dugotrajnog “preživljenja” virusa (slika 9)



Slika 9. Postotak preživljenja virusa CTV ovisno o pripadnosti genotipu

4.2. Detekcija virusa CTV modificiranim ELISA-testom

U slučaju primjene modificiranog postupka detekcije virusa CTV metodom ELISA korištenjem nehomogeniranih poprečnih prereza stabljika s korom, od ukupnog broja ispitivanih uzoraka (46), pozitivna i negativne reakcija zabilježena je u po 23 uzorka.

Usporedba rezultata standardne i modificirane metode pokazala je visoku pouzdanost rezultata dobivenih modificiranim pristupom. U samo jednom od 46 uzoraka modificirana metoda dala je rezultat drugačiji od standardne ELISA-metode. Korištenjem oba pristupa odsutnost virusa dokazana u 47,8% uzoraka, dok je njegova prisutnost potvrđena u 50% uzoraka. Neidentični rezultat dobiven je u 1 slučaju (2,2%), kada je standardna detekcija ukazala na prisutnost virusa, a modificirani postupak ne. U 97,8% slučajeva, i standardna ELISA metoda i modificirana ELISA metoda primjenjena na poprečnom prerezu grane sa korom, daju isti rezultat, odnosno između ove dvije metode postoji visok stupanj korelacije. (Tablica 7)

Tablica 7. Učestalost reakcija na prisustvo virusa CTV prema načinu primjene ELISA metode (standard i modificirani/prerez uzorka sa korom)

Prisustvo CTV		Rezultat ELISA testa - prerez sa korom		Ukupno
		negativan	pozitivan	
Rezultat ELISA testa - standard	negativan	47,8% (22)	0	47,8% (22)
	pozitivan	2,2% (1)	50,0% (23)	52,2% (24)
Ukupno		58,7% (27)	50,0% (23)	100,0% (46)

Modificirani postupak također je primjenjen u svrhu eventualne detekcije virusa u drvu biljaka koje pokazuju simptome jamičavosti. Ovaj su puta korišteni poprečni prerezi bez floemskog tkiva, a dobiveni rezultati uspoređeni su s pojavom i intenzitetom uočenih simptoma jamičavosti drva. Od ukupnog broja uzoraka (46), kod 58,7% (27) nisu nađeni simptomi jamičavosti drveta, dok je 41,3% (19) uzorka pokazalo simptome različitog intenziteta, od blagih do jakih. Prisutnost, odnosno odsutnost simptoma jamičavosti drva u skladu s hipotezom, dokazana je i modificiranim ELISA-pristupom u 82,6% slučajeva. U preostalaih 17,4% rezultati su bili proturiječni. U 4 slučaja (8,7%) simptomi su bili prisutni, no modificirani pristup nije potvrdio prisutnost virusa u prerezima bez floema. Također, u 4

slučaja (8,7%) modificirani pristup potvrdio je prisutnost virusa u prerezima bez floema, iako biljke nisu pokazivale simptome jamičavosti drva(tablica 6).

5. RASPRAVA

U Republici Hrvatskoj virus tristeza prisutan je od samih početaka uzgoja agruma te se pretpostavlja da je u zemlju introducirao zaraženim sadanicama. S obzirom na postojanje preduvjeta koji pogoduju njegovom rasprostranjivanju, prisutnost vektora i velika raznovrsnost virusnih genotipova, nužno je provoditi kontinuiranu kontrolu nasada kakva je praksa i u ostalim mediteranskim zemljama. Zbog iznimne genomske raznovrsnosti virusa CTV na našim prostorima postoji i realna opasnost od rasprostranjivanja izuzetno patogenih genotipa virusa iz Hrvatske u susjedne mediteranske zemlje, gdje uzgoj agruma predstavlja značajnu ekonomsku granu, a gdje ove izuzetno virulentne varijante do sada nisu zabilježene (Černi 2009).

Serološka detekcija metodom ELISA zbog svoje cijene, jednostavnosti primjene i mogućnosti testiranja velikog broja uzoraka istovremeno još uvijek predstavlja najpogodniji test za detekciju virusa CTV. Budući da standardna izvedba testa podrazumijeva prethodnu mehaničku obradu floemskog tkiva te njeno homogeniranje korištenjem sterilnih tarionika, cilj rada bio je provjeriti mogućnost korištenja poprečnih prereza grančica s floemskim tkivom, odnosno zelenom korom, za ovu analizu. Ovakvim modificiranim pristupom vrijeme pripreme uzorka bi se skratilo, a postupak se pojednostavio i pojeftinio. Razlog tome je da je prereze grančica lako moguće prirediti i direktno na polju prilikom uzorkovanja. Korištenjem steriliziranih nožića spriječila bi se međusobna kontaminacija uzoraka, a uzorci bi se analizi mogli podvrgnuti puno brže te bi se izbjegla potreba korištenja sterilnih tarionika.

Promatrajući karakteristike uzorkovanih biljaka, glavninu uzorka je činila meksička limeta, ciljano inokulirana 2008. godine svim opisanim genotipovima virusa CTV s ciljem biološke karakterizacije, odnosno određivanja fenotipa koji određeni genotipovi daju na ovoj indikatorskoj biljci. Meksička limeta odabrana je iz razloga što od svih indikatorskih biljaka daje najširi raspon simptoma pri infekciji različitim genotipovima. Broj uzoraka inokuliran različitim genotipovima bio je podjednak. Po šest uzoraka bilo je inokulirano virusom CTV genotipa 1 i 3a, po 5 genotipovima 2, 4, 3b+5 i M, dok su dva bila inokulirana virusom CTV iz filogenetske grupe 5. Meksička limeta razvija predvidljive simptome zaraze vidljive u roku od 2-6 mjeseci u stakleniku s kontroliranom temperaturom od 18-25°C (Wallace i Drake 1951, Al-Senan i sur. 1997). Testiranje provedeno po inokulaciji potvrdilo je da su sve inokulirane biljke bile su CTV-pozitivne i dale simptome karakteristične za pojedini virusni genotip. Prisutnost virusa bila je potvrđena metodom ELISA, a intenzitet simptoma jamičavosti drva kvantificiran je za svaku skupinu.

Primjenom standardnog postupka detekcije virusa CTV, metodom ELISA korištenjem homogeniziranog floemskog tkiva, u ovom je istraživanju preko polovice uzorka je pokazivalo pozitivnu reakciju, odnosno pokazalo sedmogodišnje „preživljenje”. Razlog za neočekivano nisko „preživljenje” vjerojatno leži u utjecaju nepovoljnih vremenskih uvjeta (suša, izrazito visoke i niske temperature) kojima su biljke u ovom periodu bile izložene. Iz literature je poznato da vanjski faktori, osobito temperatura, imaju utjecaj na replikaciju brojnih biljnih virusa, pa tako i na replikaciju virusa tristeza (Cowell i sur. 2016). Temperatura utječe na biologiju virusa i određuje stopu replikacije. Redukcija replikacije može inhibirati sistemsku infekciju, utjecati na intenzitet simptoma, sintezu određenih proteina te uspješnost detekcije virusa CTV serološkim metodama. Od genotipova koji ne izazivaju simptome jamičavosti (M i 5) drva niti jedan nije preživio 7 godina nakon zaražavanja. Genotip koji izaziva blaže simptome (1) preživio je u trećini zaraženih stabala. Genotipovi koji izazivaju snažnije simptome (2 i 3a) su pokazali mnogo bolje preživljenje; 83,33% i 40%, dok su najsnažniji genotipovi (4 i 3b+5) pokazali 100% preživljenje. Pretpostavka ovog istraživanja je da genotipovi koji uzrokuju jamičavost imaju sposobnost boljeg „preživljanja” jer se moguće razmnožavaju u živim stanicama drva. Razmnožavanje virusa CTV u tkivu drva do sada nije literaturno zabilježeno, ali literatura pokazuje kako su kod nekih drugih biljnih virusa, *Turnip mosaic virus*, čestice detektirane i u floemskom tkivu (Wan i sur. 2015). Ovo bi objasnilo zapažanje ovog istraživanja da ulazak virusnih čestica u tkivo drva može pomoći pri preživljenju nepovoljnih ekoloških uvjeta i osigurati dugogodišnje „preživljanje” virusa CTV.

Pri primjeni modificiranog postupka detekcije virusa CTV metodom ELISA korištenjem nehomogeniziranih poprečnih prereza stabljika zaražene biljke sa zelenom korom (floemom), rezultati istraživanja bili su u skladu s onima dobiveni standardnim ELISA-protokolom. Samo u jednom od 46 slučajeva modificiranim pristupom nije detektiran virus koji je uspješno detektiran standardnim pristupom. Pretpostavka je da prerez s korom daje slične rezultate kao i homogenizirana kora zbog fizičkog oštećenja stanica prilikom pripreme prereza, što dovodi do oslobađanja virusa iz stanica. Također u ekstrakcijskom puferu se nalazi snažan sufraktant tween 20 koji dovodi do liziranja stanica biljke. Zaključak je da postoji značajan, veoma visok stupanj pouzdanosti rezultata standardne i modificirane ELISA metode kada su primijenjene na homogeniziranom floemu i poprečnom prerezu grane s korom. Sličan pristup koristi se i kod metode DTBIA (*Direct Tissue Blot Immunoassay*) gdje se stanični sok nakon poprečnog presjecanja tkiva otiskuje na membranu na kojoj se kasnije radi serološka detekcija virusa. I ova metoda pokazuje visoku podudarnost rezultata s klasičnom ELISA-detekcijom (Hančević i sur. 2012). Korištenje prereza s korom je značajno skratilo vrijeme i pripremi

postupak potreban za detekciju prisustva virusa. Također je moguće pripremiti uzorak za detekciju na samom mjestu uzorkovanja u nasadu, čime se izbjegava potreba za pohranom uzoraka i mehaničkom obradom floema korištenjem sterilnih tarionika. Ovaj pristup pokazao je obećavajuće rezultate i zasigurno ga je potrebno optimizirati i iskušati na drugim virusnim modelima.

Pristup ELISA-detekcije u kojem su korišteni poprečni prerezi bez floema, s odstranjenom zelenom korom, s ciljem detekcije samo onih genotipova koji uzrokuju jamičavost drva dao je obećavajuće, ali ne ipotpuno pouzdane rezultate. Pretpostavka je bila da bi zbog eventualne lokalizacije virusnih čestica u drvu, gdje su i vidljivi simptomi, ovim pristupom uspjeli detektirati samo genotipove koji uzrokuju ove simptome. Kada se usporede vanjski simptomi uočeni na oguljenim grančicama i rezultati ELISA-testiranja istih grančica, uočeno je nekoliko nesukladnosti. U četiri slučaja virus je detektiran u prerezu bez kore unatoč nedostatku simptoma jamičavosti drva. Ova nepodudarnost se može objasniti time da u mladoj grančici virus nije prisutan u odgovarajućoj koncentraciji kako bi uspio izazvati simptom vidljiv kao jamičavost drva. U druga 4 slučaja virus nije detektiran u prerezu, iako je biljka pokazivala simptome jamičavosti. Mogući razlog ovakvog rezultata je da zbog nasumičnog odabira prereza virusne čestice nisu detektirane na određenom dijelu grančice, iako bi na drugom prerezu možda bile detektirane. Kako bi se ova pretpostavka potvrdila, potrebno je provesti dodatna istraživanja.

Budući da nismo imali pristup zaraženim stablima nismo mogli provjeriti postojanje simptoma jamičavosti drva. . Ova metoda detekcije, iako su zabilježeni određeni problemi, pokazuje potencijal za detekciju sojeva koji izazivaju jamičavost. Ovo je prvi predloženi pristup koji bi omogućio ovakvu selektivnu detekciju SP-genotipova. Pretpostavka da se genotipovi koji izazivaju jamičavost razmnožavaju i u parenhimskim stanicama drva se može istražiti u idućim istraživanjima. Istraživanje koje su proveli Wan i sur. 2015. godine na virusu mozaika repe (*Turnip mosaic virus*, TuMV) je pokazalo, pomoću fluorescijske mikroskopije, da se virusne čestice kreću kroz floem i ksilem. U skladu s tim je rezultat ovog rada koji bi nadalje trebalo provjeriti primjerice fluorescencijskom mikroskopijom koristeći obilježena protutitijela specifična za protein virusa CTV. Poprečni prerez bez kore bi bio inkubiran sa obilježenim antitijelima i promatralo bi se postojanje replikacijskih proteina u stanicama drva.

Nažalost, zbog fenomena ozdravljenja svih biljaka zaraženih genotipovima koji ne uzrokuju jamičavost drva, u istraživanju nije bilo prave negativne kontrole, što bi u budućim istraživanjima također trebalo ispraviti.

6. ZAKLJUČAK

Pretpostavka istraživanja bila je da će modificirana metoda uz korištenje prereza grana s floemom dati rezultate identične onima dobivenim iz ekstrakata floema, dok će korištenje prereza grana bez floema dati pozitivne rezultate samo kod biljaka sa simptomima jamičavosti drva. U skladu sa zadanim ciljevima izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Standardnom ELISA-detekcijom potvrđena je prisutnost virusa u 52,2% testiranih uzoraka, što ukazuje na relativno nisko sedmogodišnje preživljenje virusa tristeza u inficiranim indikatorskim biljkama.
2. Stopa sedmogodišnjeg preživljenja virusa CTV u indikatorskim biljkama razlikovala se kod različitih virusnih genotipova. Općenito, genotipovi koji uzrokuju simptome jamičavosti drva (genotipovi 1, 2, 3a, 3b i 4) pokazali su veće preživljenje od genotipova koji ne uzrokuju jamičavost drva (genotipovi M i 5), kod kojih se tijekom sedam godina, vjerojatno zbog nepovoljnih utjecaja okoliša, dogodila spontana eliminacija virusa.
3. Usporedba standardnog i modificiranog (korištenje poprečnog prereza drva s floemom) pristupa ELISA dala je gotovo identične rezultate. Modificirana metoda pokazala je nešto manju osjetljivost, odnosno dala je identičan rezultat u 97,8% slučajeva.
4. Modificirana metoda uz korištenje prereza drva bez floema pokazala je potencijal za detekciju virusnih genotipova koji uzrokuju jamičavost drva. U 8,7% slučajeva prisutnost virusa u drvu nije bila dokazana ovim pristupom, unatoč vidljivim simptomima jamičavosti. U sljedećih 8,7% slučajeva unatoč detekciji virusa u drvu modificiranom ELISA-metodom, simptomi jamičavosti nisu vizualno uočeni.

7. LITERATURA

- Agranovsky AA, Lesemann DE, Maiss E, Hull R, Atabekov JG (1995) “Rattlesnake” structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2470–73.
- Agranovsky AA. 1996. Principles of molecular organization, expression, and evolution of closteroviruses: over the barriers. *Adv. Virus Res.* 47:119–58.
- Albiach-Marti M.R., Mawassi M., Gowda S., Satyanarayana T., Hilf M.E., Shanker S., Almira E.C., Vives, C. Lopez M.C., Guerri J., Flores R., Moreno P., Garnsey S.M. and Dawson W.O. (2000) Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical, *J. Virol.*,74, 6856-6865.
- Al-Senan A., Bonsi C.K., Basiouny F.M. (1997) Indexing of Citrus tristeza virus using serological and biological tests. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 110:77-79.
- Ambros S, El-Mohtar C, Ruiz-Ruiz S, Pena L, Guerri J, et al. (2011) Agroinoculation of Citrus tristeza virus causes systemic infection and symptoms in the presumed nonhost *Nicotiana benthamiana*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 24:1119–31
- Ambros S, Ruiz-Ruiz S, Pena L, Moreno P. (2013) A genetic system for Citrus tristeza virus using the non-natural host *Nicotiana benthamiana*: an update. *Front. Microbiol.* 4:165.
- Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D (1979) The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv Virus Res* 25: 93-168.
- Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitz M, Purcifull DE, et al. (1979) The use of enzymelinked immunosorbent assay for detection of Citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190–94.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G, Cohen J. (1972) Further purification and characterization of particles associated with citrus tristeza disease. *Virology* 50:821–28.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF (1989). The continuous challenge of Citrus tristeza virus control. *Annu Rev Phytopathol* 27: 291-316.
- Bar-Joseph, M., Loebenstein, G. and Oren, Y. (1974) Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. L.G. Weathers and M. Cohen (Eds), *Proceedings 6th Conference, International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, California, pp. 83-85.
- Bar-Joseph, M.; Roistacher, C.N.; Garnsey, S.M. (1983). The epidemiology and control of citrus tristeza disease. In: *Plant virus epidemiology* (Ed. by Plumb, R.T.; Thresh, J.M.), pp. 61-72. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

- Baruah BR, Kashyap A, Nath PD. (2015) Citrus tristeza virus a worldwide threat to Citriculture: Advances made in its Research and Future thrust. *Res. J. Agriculture and Forestry Sci.* Vol. 3(8), 7-14.
- Bove C, Vogel R, Albertini D, Bové JM. (1988) Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 10:14–16.
- Brlansky RH, Garnsey SM, Lee RF, Purcifull DE. (1984) Application of Citrus tristeza virus antisera in labeled antibody, immunoelectron microscopical, and sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion tests. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 9:337–42
- Brlansky RH, Lee RF, Garnsey SM. (1988) In situ immunofluorescence for the detection of Citrus tristeza virus inclusion bodies. *Plant Dis.* 72:1039–41.
- Cambra M, Camarasa E, Gorris MT, Garnsey SM, Carbonell E. (1991) Comparison of different immunosorbent assays for Citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 11:38–45.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Olmos, A., Martínez, M.C., Román, M.P., Bertolini, E., López, A. & Carbonell, E.A. (2002) European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for Citrus tristeza virus in adult trees. In J. da Graça, R. Milne & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 69–77. Riverside, CA.
- Candresse, T, Martelli G.P. (1995) Closterovirus genus. *Archives of Virology, Supplement* 10, 461-464.
- Çevik B, Yardimci N, Korkmaz S. (2013) The First Identified Citrus tristeza virus Isolate of Turkey Contains a Mixture of Mild and Severe Strains. *The Plant Pathology Journal*; 29(1):31-41.
- Costa AS, Muller GW. (1980) Tristeza controlled by cross protection, a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.* 64:538–41.
- Cowell, S.J., Harper, S.J., & Dawson, W.O. (2016). Some like it hot: citrus tristeza virus strains react differently to elevated temperature. *Archives of Virology*, 161, 3567-3570.
- Černi S. (2009) Molekularna varijabilnost i populacijska struktura hrvatskih izolata virusa tristeza (Citrus tristeza virus). *Doktorska disertacija, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.*
- da Graça, J.V. & van Vuuren, S.P. (2010) Managing Citrus tristeza virus losses using cross protection. In A.V. Karasev & M.E. Hilf, eds. *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases*, pp. 247–260. Eagan, MN, APS Press. 304 pp.
- Davino M, Catara A (1986) La tristeza degli agrumi. *Informatore Fitopatologico* 36: 9-18.

Dawson WO, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Moreno P. (2015) Citrus tristeza virus: Making an Ally from an Enemy. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2015. 53:7.1–7.19.

Dawson WO, Folimonova SY. (2013) Virus-based transient expression vectors for woody crops: a new frontier for vector design and use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:321–37.

Dolja VV, Karasev AV, Koonin EV (1994) Molecular biology and evaluation of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annu Rev Phytopathol* 32: 261-316.

Dolja VV, Kreuze JF, Valkonen JPT (2006) U: Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res* 117: 38-517.

EPPO Standards (2017) EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. PM 1/2(26) English. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, September, 2017.

Fawcett HS, Wallace JM. (1946) Evidence of the virus nature of citrus quick decline. *Calif. Citrogr.* 32:88–89.

Folimonova SY, Robertson CJ, Shilts T, Folimonov AS, Hilf ME, et al. (2010) Infection with strains of Citrus tristeza virus does not exclude superinfection by other strains of the virus. *J. Virol.* 84:1314–25.

Fraser L. (1952) Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus, *Agricultural Gazette N S Wales*, 63, 125-131

Garnsey SM, Gonsalves D, Purcifull DE. (1977) Mechanical transmission of Citrus tristeza virus. *Phytopathology* 67:965–68.

Garnsey SM, Gonsalves D, Purcifull DE. (1979). Rapid diagnosis of Citrus tristeza virus infection by SDS immune-diffusion procedures. *Phytopathology* 69:88–95.

Garnsey SM, Gumpf DJ, Roistacher CN, Civerolo E, Lee RF, Yokomi RK, Bar-Joseph M. (1987) Toward a standard evaluation of the biologically properties of Citrus tristeza virus. *Phytophylactica*; 19:151–157.

Garnsey SM, Muller GW. (1988) Efficiency of mechanical transmission of Citrus tristeza virus. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 10:46–54.

Garnsey SM, Muller GW. (1988) Efficiency of mechanical transmission of Citrus tristeza virus. *Proc. Int.Organ. Citrus Virol.* 10:46–54 .

Garnsey SM, Permar TA, Cambra M, Henderson CT. (1993) Direct tissue blotting immunoassay (DTBIA) for detection of Citrus tristeza virus (CTV). *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 12:39–50.

Gillings M.P., Broadbent, J. Indsto and R.F. Lee. (1993) Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 44:305–317.

Gottwald TR, Abreu-Rodriguez E, Yokomi RK, Stansly PA, Riley TK. (2002) Effects of chemical control of aphid vectors and of cross-protection on increase and spread of Citrus tristeza virus. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 15:117–30.

Gottwald TR, Garnsey SM, Sediles-Jean A, Rojas-Solis A. (1996) Co-diffusion of serologically distinct isolates of Citrus tristeza virus vectored by *Toxoptera citricida* in northern Costa Rica. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 13:112–19

Costa AS, Muller GW. (1980) Tristeza controlled by cross protection, a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.* 64:538–41.

Guerri J., Moreno P., Munoz N. and Martinez M.E., (1991) Variability among Spanish Citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis, *Plant Pathol.*, 40, 38-44.

Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO, Gowda S. (2014) Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *J. Biotechnol.* 176:42–49.

Hančević K., Černi S., Radić T., Škorić D.(2012) Comparison of different methods for Citrus tristeza virus detection in Satsuma mandarins. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 119 (1), 2–7,ISSN 1861-3829.

Hančević, K. (2009). Patogeni potencijal monofiletskih izolata virusa tristeza (Citrus tristeza virus), doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Harper SJ, Cowell SJ, Robertson CJ, Dawson WO. (2014) Differential tropism in roots and shoots infected by Citrus tristeza virus. *Virology* 460–461:91–99.

Harper SJ. (2013) Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. *Front. Microbiol* 4:93.

Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA. (1984) Transmission of Citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 9:23–27.

Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA. (1988) Comparative aphid transmission of a common Citrus tristeza virus isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 10:68–70.

Herrera-Isidró L, Ochoa-Sánchez JC, Rivera-Bustamante R, Martínez-Soriano JP. (2009) Sequence diversity on four ORFs of Citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. *Virol J.*;6:116.

Hilf, M.E., V.A. Mavrodieva and S.M. Garnsey. (2005) Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95: 909-917.

Karasev AV (2000) Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. *Annu Rev Phytopathol* 38: 293-324.

Kitajima EW, Silva DM, Oliveira AR, Muller GW, Costa AS (1963) Threadlike particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature* 201: 1011-1012.

S. Korkmaz , B. Cevik , S. Onder , K. Koc & O. Bozan (2008) Detection of Citrus tristeza virus (CTV) from Satsuma Owari mandarins (Citrus unshiu) by direct tissue blot immunoassay (DTBIA), DAS-ELISA, and biological indexing, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36:4, 239-246

Liu Z, Chen Z, Hong J, Wang X, Zhou C, Zhou X, Wu J. (2016) Monoclonal antibody-based serological methods for detecting Citrus tristeza virus in citrus groves. *Virol Sin.* 31(4):324-30.

Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15742-15747.

Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li W-X, Falk BW, et al. (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15742–47.

Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja VV, Falk BW, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev AV, Minafra A, Namba S, Vetten HJ, Wisler GC, Yoshikawa N (2002) The family Closteroviridae revised. *Arch Virol* 147: 2039-2044.

Martin S, Sambade A, Rubio L, Vives MC, Moya P, et al. (2009) Contribution of recombination and selection to molecular evolution of Citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 90:1527–38.

Mawassi M, Gafny R, Bar-Joseph M.(1993) Nucleotide sequence of the coat protein gene of Citrus tristeza virus, Comparison of biologically diverse isolates collected in Israel. *Virus Genes*; 73:265–275.

Mawassi M., Karasev A.V., Mietkiewska E., Gafny R., Lee R.F., Dawson W.O. and Bar-Joseph M., (1995) Defective RNA molecules associated with Citrus tristeza virus, *Virol.*, 208, 383-387.

McClellan APD, Van der Plank JE. (1955) The role of seedling yellows and stem pitting in tristeza of citrus. *Phytopathology* 45:222–24.

Meneghini M. (1946) Sobre a natureza e transmissibilidade do doencia “tristeza” dos citrus. *O Biol.* 12:285–87.

Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L. (2008) Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol.* 9(2):251–68.

Muller GW, Rodriguez O, Costa AS. (1968) A tristeza virus complex severe to sweet orange varieties. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 4:64–71.

Narvaez, G., B.S. Skander, M.A. Ayllon, L. Rubio, J. Guerri and P. Moreno. (2000) A new procedure to differentiate Citrus tristeza virus isolates by hybridization with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J. Virol. Methods* 85:83–92.

Niblett CL, Genc H, Cevik B, Halbert S, Brown L, Nolasco G, Bonacalza B, Manjunath KL, Febres VJ, Pappu HR, Lee RF (2000) Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res* 71: 97–106.

Niblett CL, Genc H, Cevik B, Halbert S, Brown L, Nolasco G, Bonacalza B, Manjunath KL, Febres VJ, Pappu HR, Lee RF. (2000) Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res*;71:97–106.

Nolasco G, Santos C, Silva G, Fonseca F. (2009) Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for Citrus tristeza virus based on the coat protein gene. *J. Virol. Methods*;155:97–108.

Raccah B., Loebenstein G. and Bar-Joseph M., (1976) Transmission of Citrus tristeza virus by melon aphid, *Phytopathology*, 66, 1102–1104.

Rocha-Pena MA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa-Corona FM, et al. (1995) Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Dis.* 79:437–445.

Rocha-Peña, M.A. Lee, R.F. (1991) Serological techniques for detection Citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods*, 34(3):311–31

Roistacher CN (1981) A blueprint for disaster. The history of seedling yellows disease. *Citrograph* 67: 4–24.

Roistacher CN, Dodds JA. (1993) Failure of 100 mild Citrus tristeza virus isolates from California to cross protect against a challenge by severe sweet orange stem pitting isolates. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 12:100–107.

Roistacher, C.N. (1976) Detection of citrus viruses by graft transmission: a review. In: E.C. Calavan (Ed), *Proceedings 7th Conference, International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, California, pp. 175–184.

Rubio, L., M.A. Ayllón, J. Guerri, H. Pappu, C.L. Niblett and P. Moreno. (1996) Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.* 129: 479-489.

Ruiz-García N., Mora-Aguilera G., Rivas-Valencia P., Ochoa-Martínez D., Góngora-Canul C., Loeza-Kuk E., Gutiérrez-E. M. A., Ramírez-Valverde G., Álvarez-Ramos R. (2005) Probability Model of Citrus tristeza virus Detection in the Tree Canopy and Reliability and Efficiency of Direct Immunoprinting-ELISA. 196 Sixteenth IOCV Conference—Citrus tristeza virus.

Ruiz-Ruiz, S., P. Moreno, J. Guerri and S. Ambrós. (2009) Discrimination between mild and severe Citrus tristeza virus isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology* 99:307-315.

S. Korkmaz , B. Cevik , S. Onder , K. Koc & O. Bozan (2008) Detection of Citrustristezavirus (CTV) from Satsuma Owari mandarins (Citrisunshiu) by direct tissue blot immunoassay (DTBIA), DAS-ELISA, and biological indexing, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36:4, 239-246,

A. Sambade, S. Ambrós, C. López, S. Ruiz-Ruiz, A. Hermoso de Mendoza, R. Flores, J. Guerri, P. Moreno (2007) Preferential accumulation of severe variants of Citrus tristeza virus in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Arch. Virol.* 152:1115–26.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Dawson WO. (2004) Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5_ region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:799–804

Satyanarayana T, Gowda S, Boyko VP, Albiach-Marti MR, Mawassi M, et al. (1999) An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7433–7438.

Schneider H. (1959) The anatomy of tristeza-virus-infected citrus In *Citrus virus diseases*, Wallace JM (Eds). Berkeley, CA: Univ Calif Div Agr Sci., 73-84.

Sekiya ME, Lawrence SD, McCaffery M, Cline K. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *J Gen Virol.*;72:1013–1020.

Šarić A, Dulić I (1990) Detection and serological identification of CTV in citrus cultivars in the lower reaches of the Neretva river valley. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 55: 171-176.

van Vuuren SP, Collins RP, da Graca JV. (1993) Evaluation of Citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Dis.* 77:24–28.

- Vives MC, Rubio L, Lopez C, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, et al. (1999) The complete genome sequence of the major component of a mild Citrus tristeza virus isolate. *J. Gen. Virol.* 80:811–16.
- Vives MC, Rubio L, Sambade A, Mirkov E, Moreno P, Guerri J. (2005) Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a Citrus tristeza virus isolate. *Virology* 331:232–37.
- Wallace JM, Drake RJ. (1972) Studies on recovery of citrus plants from seedling yellows and the resulting protection against reinfection. *Proc. Int. Organ. Citrus Virol.* 5:127–36
- Wallace, J.M. (1968) Tristeza and seedling yellows. In: Childs, J.F.L. (Ed), Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees. Agriculture Handbook No. 333. U.S. Department of Agriculture. pp. 20-27.
- Wallace, J.M. and Drake, R.J. (1951) Recent developments in studies of quick decline and related diseases. *Phytopathology* 41, 785-793.
- Wan, J., Cabanillas, D. G., Zheng, H., & Laliberté, J.-F. (2015). Turnip mosaic virus Moves Systemically through Both Phloem and Xylem as Membrane-Associated Complexes. *Plant Physiology*, 167(4), 1374–1388.
- Webber HJ (1943) The ‘Tristeza’ disease of sour-orange rootstock. *J Am Soc Hortic Sci* 43: 160-168.

9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu 16. 11 1986. U Šibeniku sam 2005. završio Medicinsko-kemijsku školu, smjer farmaceutski tehničar. Iste godine sam na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao Preddiplomski studij molekularne biologije. Prvostupničku diplomu sam stekao 2012. godine izradom završnog rada pod nazivom Robustnost u australopiteka pod vodstvom doc. dr. sc. Gorana Kovačevića. Iste godine sam nastavio studij upisom Diplomskog studija eksperimentalne biologije.